

УДК 615.322:582.684.1

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ГИПЕРФОРИНА В ТРАВЕ ЗВЕРОБОЯ ПРОДЫРЯВЛЕННОГО

© Р.Ш. Хазиев*, Л.И. Насыбуллина, А.С. Макарова, Л.Т. Мусина

Казанский государственный медицинский университет, ул. Бутлерова, 49,
Казань, 420012 (Россия), e-mail: haziev@inbox.ru

Разработан способ определения производных гиперфорина в траве зверобоя продырявленного спектрофотометрическим методом. Относительная ошибка определения не превышает 1,5%. Показано, что в траве зверобоя пятнистого (другом разрешенном для использования виде зверобоя) производные гиперфорина практически отсутствуют, что обуславливает его более низкую антимикробную активность в сравнении со зверобоем продырявленным. Производные гиперфорина локализованы преимущественно в цветках зверобоя продырявленного.

Ключевые слова: зверобой продырявленный и пятнистый, гиперфорин, стандартизация, антибактериальная активность.

Введение

В медицинской практике Российской Федерации применяются два вида рода зверобой (*Hypericum* L.): зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.) и зверобой пятнистый (четырёхгранный) (*Hypericum maculatum* Crantz., синоним *Hypericum quadrangulum* L.) семейства *Hypericaceae* (*Guttiferae*). В настоящее время трава обоих видов зверобоя используется совершенно равноценно для приготовления настоев, производства настойки зверобоя, комплексных отечественных препаратов «Простанорм» и «Фарингал», а также является составной частью ряда бальзамов и эликсиров («Панта-Форте», «Эвалар», «Виватон», «Алтайский», «Демидовский»). Сухой экстракт из травы зверобоя продырявленного входит в состав препарата «Сибектан». Кроме того, на российском рынке присутствует ряд препаратов антидепрессантного действия на основе травы зверобоя продырявленного зарубежных производителей – «Гелариум Гиперикум», «Деприм», «Негрустин». Надо сказать, что до выхода в свет Государственной фармакопеи СССР XI издания, узаконившей равноценное использование обоих видов зверобоя [1, с. 323–325], зверобой пятнистый рассматривался как примесь к зверобою продырявленному и заготовкам не подлежал [2, с. 346–347]. В европейской фармакопее официален только один вид зверобоя – зверобой продырявленный [3].

Действующие вещества травы зверобоя представлены несколькими группами природных соединений, среди которых выделяются флавоноиды, антраценпроизводные, а также гиперфорин и его производные. Государственная фармакопея СССР XI издания предусматривает стандартизацию травы зверобоя по содержанию суммы флавоноидов [1, с. 323–325], Европейская фармакопея стандартизует траву зверобоя

продырявленного по содержанию суммы производных антрацена («total hypericins») [3]. По содержанию гиперфорина (обладающего антибактериальной активностью [4]), кроме этого, ряд исследователей считает, что гиперфорин и его производные ответственны за антидепрессантные эффекты препаратов зверобоя) стандартизуются только некоторые коммерческие экстракты зверобоя, предназначенные для производства биологически активных добавок.

Хазиев Рамиль Шамилович – доцент кафедры фармакологии фармацевтического факультета с курсами фармакогнозии и ботаники, кандидат биологических наук, e-mail: haziev@inbox.ru
Насыбуллина Ляйсан Ильдаровна – студентка
Макарова Алёна Сергеевна – студентка, e-mail: anela_90@mail.ru
Мусина Линара Табрисовна – профессор кафедры микробиологии, доктор медицинских наук, e-mail: musina@kgmu.kcn.ru

* Автор, с которым следует вести переписку.

С другой стороны, производные гиперфорина описаны только для одного из используемых видов – зверобоя продырявленного, который, вероятно, и должен использоваться для получения препаратов антимикробного действия и в этом случае стандартизоваться по содержанию данной группы соединений.

Цель нашей работы – сравнительное изучение содержания производных гиперфорина в двух фармакопейных видах зверобоя и разработка доступного метода их количественного определения.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовали траву зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) и зверобоя пятнистого (*Hypericum maculatum* Crantz.), заготовленную в июне – июле 2011 года в различных районах Татарстана.

Запись УФ-спектров и определение оптических плотностей полученных растворов проводили на спектрофотометре LAMBDA 25 (Perkin Elmer, США) в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Для тонкослойной хроматографии использовали пластины «Сорбфил» (ПТСХ-АФ-В, производитель ЗАО «Сорбполимер»). Извлечения хроматографировали в системе гексан – этилацетат (9 : 1), детектирование зон гиперфорина и его производных проводили в УФ-свете при 360 нм.

Оценку антибактериальной активности проводили методом двукратных серийных разведений на мясо-пептонном бульоне (МПБ) при pH 7,0 с тест-микробом *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P [5]. Однако метод серийных разведений в МПБ зачастую не позволяет визуально определить наличие или отсутствие роста из-за помутнения среды.

Чтобы устранить этот недостаток фармакопейной методики, нами был разработан метод, где антибактериальную активность определяли, делая пересев из каждой пробирки на чашки с мясо-пептонным агаром (МПА), которые затем инкубировали в термостате в течение 18–24 ч. Отмечали рост микроорганизмов. Разведение препарата, на котором отсутствовал рост тест-штамма, характеризовало антибактериальную активность препарата.

Результаты и обсуждение

Для качественного обнаружения гиперфорина использовали тонкослойную хроматографию на силикагеле («Сорбфил») в системе гексан – этилацетат 9 : 1 [6]. На пластинку наносили гексановые извлечения из травы двух видов зверобоя. Гиперфорин обнаруживали по интенсивной сине-фиолетовой флюоресценции в УФ-свете при 360 нм. Гиперфорин был обнаружен только в извлечении из травы *H. perforatum* (рис. 1).

Для дополнительного подтверждения наличия гиперфорина в извлечении из *H. perforatum* и отсутствия его в *H. maculatum* нами были записаны УФ-спектры обоих гексановых экстрактов. Известно, что гиперфорин имеет четко выраженную полосу поглощения при длине волны 278 нм [7]. Полученные УФ-спектры стали еще одним подтверждением того, что *H. perforatum* и *H. maculatum* различаются по содержанию гиперфорина (рис. 2). УФ-спектр извлечения из *H. perforatum* имел четко выраженный максимум при 278±3 нм, тогда как у *H. maculatum* он практически отсутствовал.

Для установления корреляции между наличием гиперфорина и уровнем антимикробной активности травы зверобоя были проведены микробиологические испытания методом двукратных серийных разведений на МПБ (pH 7,0) и последующим пересевом методом репликаций на чашки Петри с МПА с тест-микробом *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P. Для этого гексан из полученных извлечений отгонялся до суха под вакуумом, остаток растворялся в 20 мл 95%-го этанола. Полученный раствор подвергался микробиологическим испытаниям (табл. 1).

Антибактериальная активность зверобоя продырявленного была в 4 раза выше зверобоя пятнистого. Таким образом, была подтверждена неравнозначность этих видов сырья в плане антимикробной активности и корреляция ее с содержанием гиперфорина.

Таблица 1. Антибактериальная активность извлечений из травы *H. perforatum* и *H. maculatum* (на культуре *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P)

Спиртовой экстракт (1 : 20), полученный после удаления гексана	Максимальное разбавление извлечения, инактивирующее размножение стафилококков
<i>H. perforatum</i>	1 : 512
<i>H. maculatum</i>	1 : 128

Следующим этапом нашей работы стала разработка метода количественного определения суммы производных гиперфорина в траве зверобоя продырявленного. В зарубежной литературе описаны способы количественного определения гиперфорина в зверобое продырявленном методом ВЭЖХ со спектрофотометрической детекцией при 278 нм. Однако применение этого метода осложняется как его собственной дороговизной, так и высокой стоимостью гиперфорина как стандартного образца – соединения очень нестойкого и чувствительного к действию света и температуры.

Нами был выбран спектрофотометрический метод, основанный на избирательной экстракции гиперфорина и его производных гексаном, измерении оптической плотности полученного раствора при 278 нм и использовании для расчетов молярного показателя поглощения гиперфорина при этой длине волны. Были определены условия исчерпывающей экстракции гиперфорина и его производных по соотношению сырья и экстрагента и продолжительности нагревания (табл. 2).

Полученные результаты показали, что условиями исчерпывающей экстракции производных гиперфорина из травы зверобоя продырявленного является 30-минутная экстракция кипящим гексаном при соотношении сырья и растворителя 1 : 100.

Таким образом, все вышеизложенное позволило нам предложить следующую методику количественного определения.

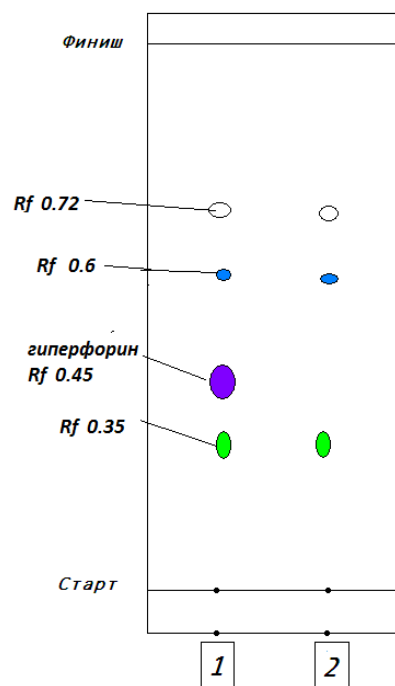


Рис. 1. ТСХ гексановых извлечений из травы *H. perforatum* (1) и *H. maculatum* (2)

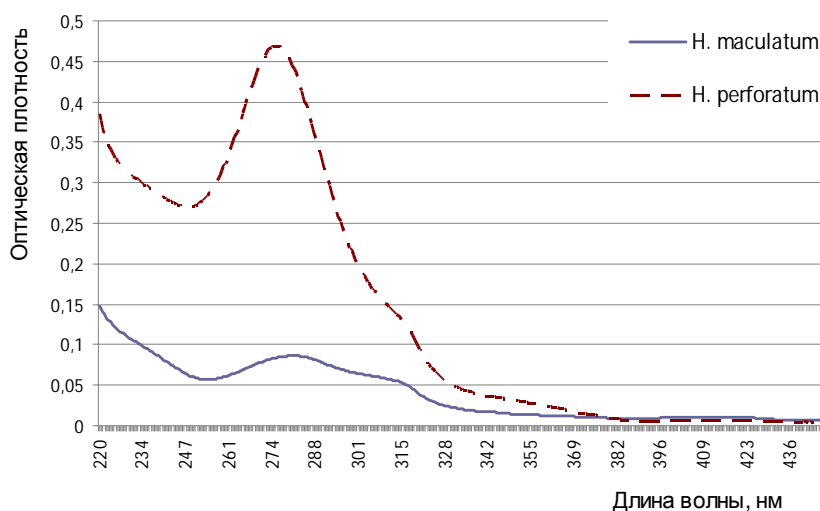


Рис. 2. УФ-спектры гексановых извлечений из травы *H. perforatum* и *H. maculatum*

Таблица 2. Зависимость выхода гиперфорина и его производных из травы *H. perforatum* в гексан от параметров экстракции

Соотношение сырье (г) – экстрагент (мл)	Время экстракции, мин	Содержание суммы производных гиперфорина в пересчете на гиперфорин, %
1 : 100	30 (при комнатной температуре)	1,0±0,0
1 : 100	60 (при комнатной температуре)	1,1±0,0
1 : 100	30 (при кипячении)	1,3±0,0
1 : 100	60 (при кипячении)	1,3±0,1
1 : 100	90 (при кипячении)	1,3±0,0
1 : 200	30 (при кипячении)	1,3±0,0
1 : 200	60 (при кипячении)	1,3±0,0

Методика количественного определения суммы производных гиперфорина в траве зверобоя продырявленного. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера 1 мм. Около 1 г сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл гексана. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане при умеренном кипении гексана в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводя объем раствора до метки гексаном.

5 мл полученного извлечения переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки гексаном. Измерение оптической плотности раствора проводят при длине волны 278 нм, используя в качестве раствора сравнения гексан. Содержание суммы производных гиперфорина в пересчете на гиперфорин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 536 \cdot 0,0006 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25}{8200 \cdot m \cdot 5 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 536 – молекулярный вес гиперфорина; 8200 – показатель поглощения $6 \cdot 10^{-4}$ М раствора гиперфорина при 278 нм [7]; m – масса сырья в граммах; W – потеря в массе при высушивании, %.

Для определения метрологических характеристик разработанной методики провели 10 параллельных определений (табл. 3).

Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительной воспроизводимости методики, ошибка единичного определения не превышает $\pm 1,5\%$.

С помощью разработанной методики мы изучили распределение производных гиперфорина в различных частях зверобоя продырявленного (табл. 4).

Производные гиперфорина накапливаются преимущественно в цветках зверобоя продырявленного.

Таблица 3. Метрологические характеристики метода определения производных гиперфорина в траве *H. perforatum*

f	\bar{X}	S ²	S	P	t (0,95; 9)	Δx	ϵ , %
9	1,3	0,0008	0,0281	0,95	2,26	0,0	1,5

Таблица 4. Содержание производных гиперфорина в различных органах *H. perforatum*

Трава	Листья	Цветки
1,3 \pm 0,0	1,3 \pm 0,1	2,8 \pm 0,2

Выводы

1. Гиперфорин накапливается только в одном из фармакопейных видов зверобоя – зверобое продырявленном и локализован преимущественно в цветках растения.

2. Антибактериальная активность зверобоя продырявленного в отношении культуры золотистого стафилококка в 4 раза выше таковой у зверобоя пятнистого и может быть обусловлена различием в уровнях содержания производных гиперфорина.

3. Разработанный способ количественного определения производных гиперфорина в траве зверобоя продырявленного отличается хорошей воспроизводимостью, ошибка не превышает 1,5%.

4. Трава зверобоя, предназначенная для получения препаратов антимикробного действия, должна стандартизоваться по содержанию производных гиперфорина.

Список литературы

1. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. 11-е изд., доп. М., 1989. 400 с.
2. Государственная Фармакопея СССР. 10-е изд., М., 1968. 1080 с.
3. European Pharmacopoeia. 5th ed. Sup. 5.6. Strasbourg, 2005.
4. Гуревич А.И., Добрынин М.Н., Колосов С.А., Поправко И.Д., Айзенман В.Е., Гарагуля А.Д. Гиперфорин – антибиотик из *Hypericum perforatum* L. // Антибиотики. 1971. №16. С. 510–513.

5. ФС 42-1348-91. Раствор хлорофиллипта спиртовый 1%. Фармакопейный государственный комитет. Введ. 10.10.91. М., 1991. 4 с.
6. Adam P., Arigoni D., Bacher A., Eisenreich W. Biosynthesis of Hyperforin *Hypericum perforatum* // *J. Med. Chem.* 2002. Vol. 45. Pp. 4786-4793.
7. Быстров, Н.С., Добрынин В.Н., Колосов М.Н., Чернов Б.К. Химия гиперфорина. VI. Общая химическая характеристика // *Биоорганическая химия*. 1978. Т. 4, №6. С. 791–797.

Поступило в редакцию 31 июля 2012 г.

*Khaziev R.Sh.**, *Nasybullina L.I.*, *Makarova A.S.*, *Musina L.T.* QUANTITATIVE DETERMINATION OF HYPERFORIN DERIVATIVES IN THE HERB OF *HYPERICUM PERFORATUM*

Kazan State Medical University, Butlerova st., 49, Kazan, 420012 (Russia), e-mail: xaziev@inbox.ru

The way of determination of spectrophotometric method of hyperforin derivatives in the herb of *Hypericum perforatum* was developed. The relative error of determination doesn't exceed 1,5%. It is shown that hyperforin derivatives are practically absent in the herb of *Hypericum maculatum* (this is different kind of *Hypericum* allowed for use), which causes its lower antimicrobial activity in comparison with *Hypericum perforatum*. Hyperforin derivatives are localized predominatly in the flowers of *Hypericum perforatum*.

Keywords: Hypericum perforatum and Hypericum maculatum, hyperforin, standardization, antibacterial activity.

References

1. *Gosudarstvennaia farmakopeia SSSR: Vyp. 2. Obshchie metody analiza. Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e. 11-e izd.* [Vol. 2. Common methods of analysis. Herbal drugs. 11th ed.]. Moscow, 1989. 400 p. (in Russ.).
2. *Gosudarstvennaia farmakopeia SSSR. 10-e izd.* [State Pharmacopoeia of the USSR. 10th ed.]. Moscow, 1968, 1080 p. (in Russ.). (in Russ.).
3. *European Pharmacopoeia. 5th ed. Sup. 5.6.* Strasbourg, 2005.
4. Gurevich A.I., Dobrynin M.N., Kolosov S.A., Popravko I.D., Aizenman V.E., Garagulia A.D. *Antibiotiki*, 1971, no. 16, pp. 510–513. (in Russ.).
5. *FS 42-1348-91. Rastvor khlorofillipta spirtovyi 1%.* [Pharmacopoeial article 42-1348-91. Hlorofillipta alcohol solution of 1%]. Moscow, 1991, 4 p. (in Russ.).
6. Adam P., Arigoni D., Bacher A., Eisenreich W. *J. Med. Chem.*, 2002, vol. 45, pp. 4786–4793.
7. Bystrov, N.S., Dobrynin V.N., Kolosov M.N., Chernov B.K. *Bioorganicheskaiia khimiia*, 1978, vol. 4, no. 6, pp. 791–797. (in Russ.).

Received July 31, 2012

* Corresponding author.

